

**METHOD FOR SUPPLYING VITAMIN E TO ANIMALS AND TOCOPHEROL PHOSPHATE FOR ANIMALS OR ITS SALTS COMPOSITION****Publication number:** JP10155429 (A)**Also published as:****Publication date:** 1998-06-16 EP0845216 (A1)**Inventor(s):** ITO SHINOBU; OGATA EIJI**Applicant(s):** SHOWA DENKO KK**Classification:**

- **International:** A23K1/18; A23K1/16; A23L1/32; A61K31/352; A61K31/355; A61K31/665; A61P3/00; C07D311/72; G01N33/82; A23K1/18; A23K1/16; A23L1/32; A61K31/352; A61K31/665; A61P3/00; C07D311/00; G01N33/82; (IPC1-7): C07D311/72; A23K1/16; A23K1/18; A61K31/355

- **European:** A23K1/16B; A23L1/32; A61K31/665; G01N33/82

**Application number:** JP19960332931 19961127**Priority number(s):** JP19960332931 19961127**Abstract of JP 10155429 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a compsn. capable of supplying vitamin E to useful animals by incorporating tocopherol phosphate or its salts into the compsn. SOLUTION: This compsn. is obtd. by incorporating the tocopherol phosphate and more preferably  $\alpha$ -tocopherol phosphate expressed by the formula R1, R2, R3 are CH3 ) or its salts (OH in the formula is ONa, OK, etc.) therein.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-155429

(43)公開日 平成10年(1998) 6月16日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
A 2 3 K 1/16  
1/18  
A 6 1 K 31/355  
// C 0 7 D 311/72

識別記号  
3 0 2  
A F C  
1 0 2

F I  
A 2 3 K 1/16  
1/18  
A 6 1 K 31/355  
C 0 7 D 311/72

3 0 2 B  
D  
A F C  
1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平8-332931

(22)出願日 平成8年(1996)11月27日

(71)出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72)発明者 伊東 忍

東京都港区芝大門1-13-9 昭和電工株  
式会社内

(72)発明者 小方 英二

東京都港区芝大門1-13-9 昭和電工株  
式会社内

(74)代理人 弁理士 菊地 精一

(54)【発明の名称】 動物に対するビタミンE供給方法および動物用トコフェロールリン酸エステル又はその塩類組成物

(57)【要約】

【課題】 動物に対して高いビタミンE活性を発現する化合物を提供すること。

【解決手段】 トコフェロールリン酸又はその塩類を動物に投与することにより動物にビタミンEを提供する。前記酸又はその塩類は組成物とし、それに抗酸化剤等を含ませることもできる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 トコフェロールリン酸エステル又はその塩類又はそれらの含有組成物を動物に投与することを特徴とする動物に対するビタミンE供給方法。

【請求項2】 動物投与用トコフェロールリン酸エステル又はその塩類又はそれらの含有組成物。

【請求項3】 トコフェロールリン酸エステル又はその塩類と抗酸化剤を含有することを特徴とする動物用トコフェロールリン酸エステル又はその塩類含有組成物。

【請求項4】 採卵用家禽に、トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する飼料を投与して飼育し、家禽よりビタミンE含有卵を得る方法。

【請求項5】 動物が家畜、家禽又は水産動物である請求項1記載のビタミンE供給方法。

【請求項6】 動物が家畜、家禽又は水産動物である請求項2又は3記載の組成物。

【請求項7】 トコフェロールリン酸エステル又はその塩類が、高速液体クロマトグラム法で測定するときトコフェロールリン酸エステル又はその塩類が95%以上であり、不純物として含まれるP、P'-ビストコフェロールジリン酸エステル又はその塩類が5%以下である高純度のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する請求項1、4又は5記載の方法。

【請求項8】 請求項7で規定する高純度トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する請求項2、3又は6記載の組成物。

【請求項9】 動物投与用組成物が100℃以上の温度で加熱製造される組成物、飼料、又は飼料添加物である請求項1、4、5又は7記載の方法。

【請求項10】 動物投与用組成物が100℃以上の温度で加熱製造される組成物、飼料、又は飼料添加物である請求項2、3、6又は8記載の組成物。

【請求項11】 トコフェロールリン酸エステル又はその塩類及びP、P'-ビストコフェロールジリン酸エステル類を定量するに当たり、オクタデシル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填高速液体クロマトグラフ用カラムを用いて分析を行う飼料又は飼料添加物中のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類の分析法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は有用動物のビタミンE源としてのトコフェロールリン酸エステル又はその塩類、これらを含有する組成物並びに前記エステル、塩類及び組成物を有用動物に投与してビタミンEを有用動物に供給する方法に関する。詳細には、動物における老化防止、病気の治療や予防、ストレスの軽減、孵化率の増加、卵質の改善、繁殖障害や乳房炎の治療や予防、乳中体細胞数の減少に大きな効果を有するビタミンE源を効率的に供給できるトコフェロールリン酸エステル又はその塩類、これらを含有する組成物、及びその動物への投

与方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ビタミンEは、不飽和脂肪酸の酸化物で老化現象の原因物質とも言われる過酸化脂質の生成を防止する作用を有し、また血管を強化し血流を盛んにする機能を有する他、抗ストレス効果を有するビタミンとして、人や他の動物にとって極めて重要な栄養素の一つである。一方畜産、水産養殖業及びペットの飼育などを営む上で老化、抗病性の低下、ストレスの発生、孵化率の減少、卵質及び肉質の悪化、繁殖障害や乳房炎、乳中体細胞数の減少がこれらの動物で発生しており、これらの解決が従来から強く求められている。

【0003】牛、豚、馬等の家畜動物、犬、猫等のペット、ラット、マウス、モルモットなどの実験用動物を含む有用哺乳動物の飼育においては、人類にとって有用なため効率的な生産が行われておりそれ故飼育密度の増加にともなう老化の促進、抗病性の低下、ストレスの発生、肉食の酸化の促進、肉食の黒化等の肉質の悪化、繁殖障害などが増加の傾向にある。また、繁殖障害などは、早期流産、受胎率の低下、排卵遅延、胚の死亡、発情徴候の微弱化、黄体ホルモンの産生低下などによってもたらされ、また乳房炎が発生すると、乳中の体細胞数が増加して、乳の商品価値が著しく低下するが、そのような繁殖障害や乳房炎などの治療や予防のために従来からビタミンE及びその誘導体を含む各種のビタミンやミネラル又はそれらを組み合わせたもの等が飲料水や飼料中に添加され有用哺乳動物に給与されている。

【0004】また、鶏、鵪、七面鳥等の家禽類などでは過密飼育によって抗病性の低下、ストレスの発生、肉質の悪化、繁殖障害の他に卵採取用の家禽類においては卵質の品質低下の問題があり、これらの問題の解決方法として従来からビタミンE及びその誘導体を含む各種のビタミンやミネラル又はそれらを組み合わせたものが飲料水や飼料中に添加されて家禽類に給与されている。また、水産養殖業などでは水産動物の過密飼育にともない上記の老化、抗病性の低下、ストレスの発生、肉質の悪化、卵質の悪化の他に孵化率の低下、体色の悪化等の問題があり、これらの問題の解決方法として従来からビタミンE及びその誘導体を含む各種のビタミンやミネラル又はそれらを組み合わせたもの等が飼料中やプレミックスに添加されてニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジ、車エビに給与されている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来のビタミンE及びその誘導体やミネラル類の組み合わせ物は、上記の動物における老化、抗病性の低下、ストレスの発生、肉質の悪化、孵化率の低下、体色の悪化、卵品質の低下、繁殖障害、乳房炎、病気の発生の治療や予防に十分な効果があるとはいえず、またビタミンE等は常

温で粘度の高い油状物質のため取り扱い性などの点においても劣っており、動物における老化、抗病性の低下、ストレスの発生、肉質の悪化、孵化率の低下、体色の悪化、卵品質の低下、繁殖障害、乳房炎、病気の発生の治療や予防により効果が高かつ取扱いが容易なビタミンE誘導体の開発が求められてきた。

【0006】従来のビタミンE及びその誘導体の効果が低い原因としては、通常の最も一般的なビタミンE源として使用されている天然 $\alpha$ -トコフェロールは、価格が高く飼料に混ぜて使用するにはコスト高になるため動物用には少量しか使用できないという問題があった。また、天然 $\alpha$ -トコフェロール及び合成の $d1-\alpha$ -トコフェロールは、抗酸化性能が良好な反面比較的速やかに酸化されるため加熱工程を経た飼料などに添加されていても製造中、又は流通過程で分解し投与した動物においてビタミンEとしての効果が十分発揮できないという問題があった。また、 $\alpha$ -トコフェロール又は合成の $d1-\alpha$ -トコフェロール、 $d1-\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルは室温で極めて粘度の高い油状物質であるため飼料等に均一に添加できず取扱いが困難で利用方法が極めて煩雑であり、また水に溶けないため乳化などの特別な加工をしない限り動物に対し飲水投与や注射による投与ができないという問題があった。これらの問題を解決するため、現在は $d1-\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルを糖類などに吸着させ粉末化したもの及び乳化剤で乳化された液状品が飼料などに添加されているが、 $d1-\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルは、比較的空気酸化を受けず安定ではあるが生体に投与しても充分な $d1-\alpha$ -トコフェロールに変換されず、ビタミンEとしての充分な効果を発揮できず、かつ酢酸エステル化合物であるため $d1-\alpha$ -トコフェロールの単体に比較し細胞に吸収されにくいという問題があった。また、 $d1-\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルを乳化剤で乳化された液状品は、乳化が困難で乳化安定性が悪く、特殊な乳化剤を使用するためコストが高くなるという問題があった。

【0007】動物に対しビタミンEを供給する具体的な例としては採卵用家禽にビタミンEを添加した飼料を給与し、ビタミンEを含有する卵を得る方法（特公昭63-50976）が知られている。しかしながら上記の従来のビタミンEを高濃度で含有する卵を生産する方法では、卵中のビタミンE濃度を十分に高い濃度にするのができないという問題があった。本発明は上記したような従来の問題に鑑み、動物に対する高い吸収効果を有し、取扱いが容易で熱に対しても安定であり、また水に溶解することも可能なビタミンE源を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記のような状況下において本発明者らは種々のビタミンEの誘導体の研究を続けてきた。その結果、ビタミンEの誘導体の一つである

$d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸エステル又はその塩類は、安定性が高く、室温で粉末であるために利用性が高く、従来の $d1-\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルに比較し有用動物の細胞に吸収され易く高いビタミンE活性を持つことを発見し、広範囲の有用動物においてその高い生物活性を見出したことから理想的なビタミンE供給源になり得ることを見出した。また、本発明者らは、鶏卵用飼料中に $\alpha$ -トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を添加することにより卵中に高濃度のビタミンEを蓄積させることを確認した。更にトコフェロールリン酸エステル類の純度が95%以上であり、不純物として含まれるP、P'-ビストコフェロールジン酸エステルが5%以下である高純度のトコフェロールリン酸エステル及びその塩類は、純度の悪いトコフェロールリン酸エステル類に比較し中性領域での水に対する溶解性が高まることを見出し動物に容易に飲水投与、注射投与できることを見出し本発明を完成させた。

【0009】即ち、本発明は以下のとおりである。

(1) トコフェロールリン酸エステル又はその塩類又はそれらの含有組成物を動物に投与することを特徴とする動物に対するビタミンE供給方法。

(2) 動物投与用トコフェロールリン酸エステル又はその塩類又はそれらの含有組成物。

(3) トコフェロールリン酸エステル又はその塩類と抗酸化剤を含有することを特徴とする動物用トコフェロールリン酸エステル又はその塩類含有組成物。

(4) 採卵用家禽に、トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する飼料を投与して飼育し、家禽よりビタミンE含有卵を得る方法。

(5) 動物が家畜、家禽又は水産動物である上記(1)記載のビタミンE供給方法。

(6) 動物が家畜、家禽又は水産動物である上記(2)又は(3)記載の組成物。

【0010】(7) トコフェロールリン酸エステル又はその塩類が、高速液体クロマトグラム法で測定するときトコフェロールリン酸エステル又はその塩類が95%以上であり、不純物として含まれるP、P'-ビストコフェロールジン酸エステル又はその塩類が5%以下である高純度のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する上記(1)、(4)又は(5)記載の方法。

(8) 上記(7)で規定する高純度トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する上記(2)、(3)又は(6)記載の組成物。

【0011】(9) 動物投与用組成物が100℃以上の温度で加熱製造される組成物、飼料、又は飼料添加物である上記(1)、(4)、(5)又は(7)記載の方法。

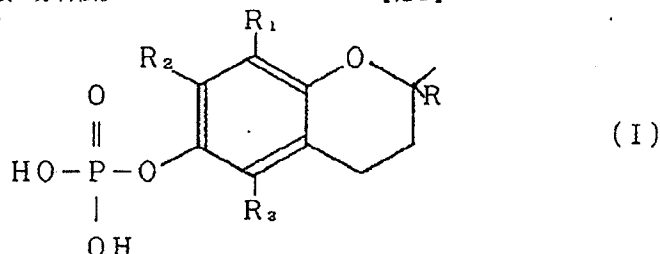
(10) 動物投与用組成物が100℃以上の温度で加熱製造される組成物、飼料、又は飼料添加物である上記(2)、(3)、(6)又は(8)記載の組成物。

(11) トコフェロールリン酸エステル又はその塩類及びP、P'ービストコフェロールジリン酸エステル類を定量するに当たり、オクタデシル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填高速液体クロマトグラフ用カラムを用いて分析を行う飼料又は飼料添加物中のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類の分析法。

\*【0012】

【発明の実施の形態】以下本発明を詳しく説明する。本発明で使用されるトコフェロールリン酸エステルは式(I)で示される。この化合物中のOHがONa、OK等となったものが塩類である。

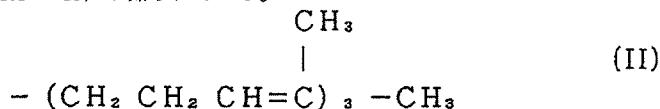
\*【化1】



ここで置換基R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、によってα-トコフェロールリン酸エステル(R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>)、β-トコフェロールリン酸エステル(R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>2</sub>=H)、γ-トコフェロールリン酸エステル(R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>1</sub>=H)、δ-トコフェロールリン酸エステル(R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>=H)、ε-トコフェロールリン酸エステル(R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>=C

※れらの中で特に好ましいのがα-トコフェロールリン酸エステルであるが他のトコフェロールリン酸エステルもビタミンEの供給源として作用し、本発明に含めることができる。更にα-トコフェロールリン酸エステル、β-トコフェロールリン酸エステルのベンゾピラン構造のO原子に隣接する炭素原子に結合した長鎖アルキル基が次式(II)

【化2】



に置き換えられた構造のε-トコフェロールリン酸エステル及びζ-トコフェロールリン酸エステルが知られており、いずれも本発明の化合物となりうる。また、各トコフェロールリン酸エステルはd体、l体、dl体があるが、いずれも本発明において使用することができる。

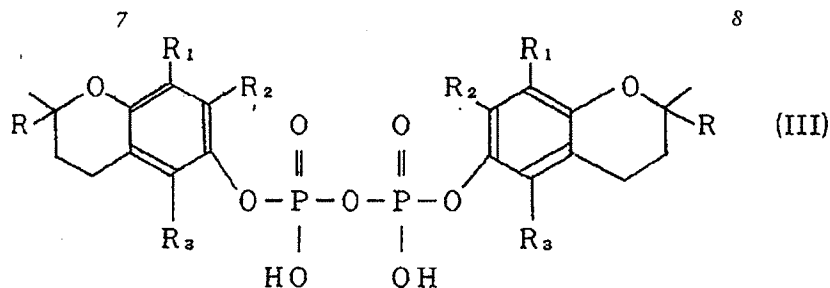
【0013】前記式(I)で表されるトコフェロールリン酸エステルはトコフェロールとオキシ三塩化リンとを反応させ、次いで酸あるいは塩基により加水分解することにより製造でき、その際に必要に応じてアルカリ塩等の塩類とすることができる。上記においてオキシ三塩化リン添加量は、トコフェロール1モルに対して好ましくは1~1.3モル当量である。反応溶媒としてベンゼン、トルエン等の非反応性溶媒を用い、反応温度は-20~50℃、好ましくは0~30℃の範囲で行われる。なお、反応の際に発生するハロゲン化水素をトラップ

グするために脱酸剤としてピリジン、トリエチルアミン、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の塩基を添加してもよい。

【0014】以上の操作を行った後にリンーハロゲン結合の塩基による加水分解を行う。使用する塩基は水酸化ナトリウム、水酸化カリウムが好適である。塩基の水溶液の濃度は好ましくは1~3規定であり、使用する塩基の量としては反応に使用したトコフェロールの好ましくは2~4モル当量に相当する量を用いる。反応は、トコフェロールとオキシ三ハロゲン化リンの反応で用いた溶媒をそのまま使用して行うことができる。反応温度は好ましくは15~35℃であり、反応時間は好ましくは1~5時間である。

【0015】上記の反応操作においては、式(I)で表されるトコフェロールリン酸エステルと式(III)

【化3】



( $R_1 \sim R_3$  及び  $R$  は前記と同じ) で表される  $P$ ,  $P'$  -ビストコフェロールジリン酸エステルが同時に生成する。これらを中性域で水に溶解させた場合、式 (III) で表される  $P$ ,  $P'$  -ビストコフェロールジリン酸エステルが溶けずに沈澱を生ずる。これを更に酸性条件下、加水分解反応を行うと、式 (III) のエステルが加水分解されて式 (I) のエステルとなり、その結果高純度のトコフェロールリン酸エステルが得られる。上記の酸としては、硫酸、リン酸が好ましい。酸性条件下の水溶液の酸濃度は特に規定することはないが、後の精製工程を考慮すると希薄な方が望ましい。反応温度、反応時間

は、好ましくは  $70 \sim 110^\circ\text{C}$ 、1時間～2時間である。

【0016】一方、リン-ハロゲン結合を加水分解して得られる、式 (I) で表されるトコフェロールリン酸エステルを製造するときに、酸性条件で加水分解を行うと、リン-ハロゲン結合が加水分解され、更に加温することによって、副生する式 (III) で表される、 $P$ ,  $P'$  -ビストコフェロールジリン酸エステルの一  $P-O-P-O-P$  結合の加水分解も行える。上記の製造方法で得られた式 (I) で示される高純度トコフェロールリン酸エステルは毒性が低くそのまま動物のビタミンE源として使用できるが、所望により有機溶媒、又は水-有機溶媒の混合溶媒中で塩基と混合することにより塩に変換することができる。塩としてはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩が挙げられる。以上のように合成した、式 (I) で表される高純度トコフェロールリン酸エステル又はそのアルカリ金属塩は  $P$ ,  $P'$  -ビストコフェロールジリン酸エステルを含まないか少ないため、以下のような清澄な溶液を与える。即ち、トコフェロールリン酸エステルが3%以下で溶液が  $\text{pH } 8.5$  となるように

水、必要により水酸化ナトリウムもしくはリン酸を加えて調整したとき、清澄な水溶液を与える。

【0017】本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類の動物への投与方法はあらゆる投与方法が使用でき特に限定されないが、例えばトコフェロールリン酸エステル又はその塩類の原体をそのまま口から投与する方法、飼料や他のビタミン類や他の医薬品などに添加するなどして経口投与する方法、トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を動物の皮膚及び粘膜に塗布、貼付することにより経皮吸収させる経皮から投与する方法、

10 トコフェロールリン酸エステル又はその塩類を適当な溶媒に希釈し必要に応じて他の薬剤も添加し注射及び注入することにより投与する方法が使用できる。また、これらそれぞれの投与を動物に対して実行するに当たりトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を配合した様々な形態の組成物をつくることことができる。本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を配合した動物投薬用組成物の例としては、飼料、プレミクス、動物薬、ミルクリプレイサー、栄養強化剤、点眼薬、注射薬、飲水薬、錠剤、ペースト剤、座薬、ソフトカプセル剤等の形態をとることができる。

20 【0018】次に、本発明のトコフェロールリン酸エステル及び/又はその塩類の定量分析について説明する。定量分析には長鎖アルキル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填高速液体クロマトグラム用カラムを用いるのが効果的である。その分析方法は、溶離液を送液ポンプに送り、分析試料を試料インジェクターを通して注入し、長鎖アルキル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填高速クロマトグラム用カラムに送り試料分離を行い、次いで該カラムからの溶出液を紫外可視分光検出器において検出分析する。本発明の分析方法で使用する長鎖アルキル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填カラムとしては、

30 オクタデシル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填カラム (例えば、昭和電工 (株) 製 Shodex RS pak D18-613、DE413) を好適に挙げることができる。分析装置については、特に制限はなく通常の高速液体クロマトグラフィー用に使用される送液ポンプ、試料インジェクター、検出器、記録計を用いることができる。カラムの材質、形状、大きさなどは特に制限はなく、例えばステンレスカラムを好ましく挙げることができる。溶離液は、メタノール/水 (酢酸ナトリウムを含む。) 系が望ましい。

40 【0019】本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類は上記の液体クロマトグラム用カラムを用い、カラム温度:  $40^\circ$ 、溶離液:  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 100/1$  (溶離液1L中  $0.05 \text{ mol CH}_3\text{COONa}$  を含む)、溶離速度:  $0.5 \text{ ml/min}$ 、検出器: 紫外可視分光器、検出波長:  $287 \text{ nm}$  である分析条件下で高速液体クロマトグラム法で測定するとき、トコフェロールリン酸エステル又はその塩類のピーク面積が総面積の95%以上、好ましくは97%以上であ

り、不純物として含まれるP、P'-ビストコフェロールジリン酸エステルのピーク面積が総面積の5%以下、好ましくは3%以下である高純度のトコフェロールリン酸エステル及びその塩類である場合、このトコフェロールリン酸エステル又はその塩類のpH3~11の水に対する溶解度が極めて改善される。

【0020】このことから本発明の組成物が、液状物質の場合、あるいは組成物の製造工程上トコフェロールリン酸エステル及びその塩類を液体で分散させ、又は溶解する場合、あるいは水溶性物質、極性物質、もしくは水

酸基を大量に含む物質に均一に分散させる目的で混合する場合には本発明の高純度トコフェロールリン酸エステル及びその塩類を使用すれば、溶解性、又は分散性が改善されビタミンE源としての効果の高い組成物を製造することができる。本発明のトコフェロールリン酸エステル及びその塩類が高純度である場合、それを含有する組成物が、液状物質の例としてはpH3~11で安定な水溶液が得られる動物の飲用水用栄養強化剤、点眼薬、注射薬等がある。

【0021】本発明の組成物の形態が注射剤等のように

完全な溶解液である必要がある場合、その注射剤のPHをpH5から9に調整し、溶解性のより高い塩の誘導体であるトコフェロールリン酸エステルのNa塩、及びトコフェロールリン酸エステルのK塩から選択される単体又は2種以上の複合物を添加することが望ましい。しかし、完全な溶解液を必要としない組成物、例えば飲用水組成物等に添加する場合は、不純物が少なく、生理学的に毒性の許容できうるトコフェロールリン酸エステルの塩類であればよく、アルカリ金属以外の塩でもよい。その例としては、Ca、Mg、Al等のアルカリ土類金属、ヘキシルアミン塩などのアミン塩類等があるが特に限定されない。

【0022】本発明における飼料等の組成物に添加できるトコフェロールリン酸エステル及びその塩類の純度及び不純物濃度は、不純物の物性、毒性などにもよるが、組成物に十分な安全性と安定性又は溶解性を期待する場合などは、前記した高速液体クロマトグラム法で測定するときトコフェロールモノリン酸エステル類のピーク面積が総面積の95%以上、好ましくは97%以上で、式(III)のP、P'-ビストコフェロールジリン酸

エステルのピーク面積が総面積の5%以下、好ましくは3%以下であるものが溶解性が良いために組成物に容易にかつ均一に配合することができる。

【0023】本発明の組成物の製造工程において高純度トコフェロールリン酸エステル及びその塩類を液体で分散させ、又は溶解する例としては、エクストルーダーやペレッターマシンなどで組成物製造時にトコフェロールリン酸エステル及びその塩類をスプレーして製造する場合や、液体状にして飼料と混合する場合である。また本発明の高純度トコフェロールリン酸エステル及びその塩

類を水溶性物質、極性物質、もしくは水酸基を大量に含む物質に均一に分散させる目的で混合する例としては、組成物が蛋白質又は澱粉質を含有する飼料等に含有する際に分散性が改善され、ビタミンE源としての効果の高い飼料を製造することができる。モイスト飼料等水分含量の高い飼料に配合する場合は一層の分散性が得られて良い。

【0024】また本発明の動物投与用組成物が、飼料である場合には、飼料の形態によらず安定に配合することができる、例えば粉末飼料、ペレット飼料、クランブル飼料、エクストルーダー飼料、エクспанション飼料、モイスト飼料、ペースト飼料、流動飼料、液状飼料がある。特に本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類は、100℃以上の高温でもその安定性を損なうことがないため、100℃以上の高温で処理されるエクストルーダー飼料、エクспанション飼料には最適である。また、スチームなどで加湿される工程を持つ粉末飼料、ペレット飼料にも適している。トコフェロールリン酸エステル又はその塩類含有組成物の製造法が加熱工程を含む工程で製造される組成物であっても、本発明の組成物は安定のまま製造することができる。例えば加熱工程にペレッタ、エキスパンダー、エクストルーダー、各種乾燥機等の加熱又は加圧装置を用いて本発明の組成物を加工できる。

【0025】本発明の組成物に含有されるトコフェロールリン酸エステル又はその塩類の量は動物に対するビタミンEの栄養学的な効果を要求する場合、組成物の全重量に対し0.1ppm以上から1000ppm以下を通常配合する。投与対象動物が成長期の動物やストレスや疾病などに感染又は感染の危険のある時期などは飼料中のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類が20ppm以上1000ppm以下を配合する。配合上限についてはこれ以上の量を投与することもできるが、投与量増加にともなう効果がプラトーになること、及び動物によってはビタミンE過剰症を発生する場合があることなどから1000ppmを越えないことが望ましい。

【0026】本発明の組成物の投与可能な動物は特に限定されないが、本発明の組成物の投与は特に人工的に高密度飼育又は繁殖される動物に特に効果がある。それらの動物の例としては、動物が家畜、家禽又は水産繁殖動物であり、例えば鶏、鴨、ミツバチ、牛、豚、馬、犬、猫、実験用齧歯類動物、ニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジ、車エビ等がある。人工的に高密度飼育又は繁殖される動物は、通常の状態よりもストレスがかかりやすく、その為にビタミンE要求性が高まっていると考えられる。

【0027】本発明の飼料又は栄養組成物は、牛、馬、豚、ヤギ、羊などの家畜類に給与すると、それによってそれらの家畜の繁殖障害の改善や繁殖促進、乳房炎の防止や回復促進、下痢などの病気の防止を図ることができる。

る。特に、雌牛に給与した場合には、その繁殖促進（回復）作用によって、短期間で受精可能な状態にすることができる。更に、乳房炎の回復が速やかに行われる結果、搾乳された牛乳中に乳房炎に起因する体細胞の混入量が減少して、体細胞数の少ない良質の牛乳を得ることができる。

【0028】本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する組成物に抗酸化剤を添加し同時に投与すると効果が高まる。その抗酸化剤としては、ビタミンC及びその誘導体、カロチン及びその誘導体、アスタキサンチン、ルテイン、d1- $\alpha$ -トコフェロール酢酸エステル、 $\alpha$ -トコフェロール及びその誘導体、SOD、グルタチオン、カテキン類及びこれらのコーティング品を挙げることができる。上記のビタミンCの誘導体としては、L-アスコルビン酸カルシウム、L-アスコルビン酸-2-リン酸及びそのマグネシウム、ナトリウム、カルシウム、アルミニウム等の塩類、L-アスコルビン酸-2-グルコシド及びその塩類から選択される一種以上の物質との単体又は混合物である。上記のカロチン及びその誘導体の例としては、 $\beta$ カロチン、 $\alpha$ カロチン、レチノイン酸、レチノール、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、ルテイン及びその異性体などがある。

【0029】本発明の組成物には更に各種の添加物を配合することができる。添加物としては穀粉（小麦粉や澱粉等）、フスマ、豆粉、糖類（ブドウ糖等）、米糠、油かす、ビタミンA、増粘剤、ミネラル、調味料、香辛料、牧草等を挙げることができる。組成物の形態としては、例えば粉末、散剤、錠剤、ペレット、細粒剤、カプセル剤などが挙げられる。錠剤等を製造する場合、必要に応じ賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤等を用いて常法により行えばよい。

【0030】賦形剤としては、例えば、乳糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、白糖等の糖類、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン等のデンプン類、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、沈降炭酸カルシウム等の無機塩類等が挙げられる。

【0031】崩壊剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、部分アルファ化デンプン等のデンプン類、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース等のセルロース誘導体、ポリビニルピロリドン等を架橋構造にした、その他合成高分子類等が挙げられる。

【0032】結合剤としては、例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム等の高分子類等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、タルク、ロウ類、軽質無水ケイ酸等の天然物由来及びその誘導体等、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、

ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム、ショ糖脂肪酸エステル糖の脂肪酸及びその金属塩類等が挙げられる。なお、錠剤には他にマクロゴール等の高分子化合物が適宜使用される。

【0033】本発明の組成物が家畜用飼料である場合、取扱い性、家畜への給与のし易さ、家畜による嗜好性などの点から、一般に、最大部分の寸法が1~10mmの範囲で且つ最小部分の寸法が1~10mmの範囲にあるような小粒状のペレット又は粒状体にするのが好ましい。特にペレットの場合は、直径が2~8mm、好ましくは2~4mmで、長さが3~9mm、好ましくは4~7mmの円柱体、角柱体などのペレット形状としておくのが良い。また、ペレット以外の栄養組成物の場合は、球状、楕円状、立方体、直方体、錐体やその他任意の形状としておくことができ、その形状は特に限定されない。ペレット又は栄養組成物の寸法が上記よりも大きくなると、飼料などに加えて家畜に給与した場合に、飼料中にうまく混ざらず家畜による摂取が円滑に行われなくなり易い。一方、上記の寸法よりも小さくなって、例えば粉末状などになると、流動性がなくなって取扱い性が劣るようになり、また所定量を家畜に給与するのが困難になる。本発明の家畜への給与は、毎日継続して、あるいは1日おきに、約30日~3ヶ月続けて行うとより高い効果が得られる。

【0034】また家禽飼料としては、前記の添加剤等の他従来公知の家禽飼料の製造法に従って、各種の原料を配合し調製されたものが挙げられ、例えば以下に示すとき家禽飼料が挙げられる。トウモロコシ56、2部（重量部、以下同じ）、マイロ9、0部、フスマ5、0部、脱脂米糠2、3部、大豆粕7、0部、魚粕7、0部、アルファルファミール2、0部、炭酸カルシウム7、1部、第3リン酸カルシウム1、2部、食塩0、2部、ビタミン・ミネラルミックス0、2部、タロー油脂1、0部、コーングルテンミール1、8部

【0035】本発明の組成物には更に、流動性改善剤、固結防止剤、飛散防止剤等の助剤を添加してもよい。本発明の組成物は、そのまま動物に投与してもよいが、通常、家畜、家禽又は養殖水産動物等の動物飼料に添加して、又は飲水に懸濁して投与される。投与できうる動物としては、本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類のビタミンEへの変換活性が確認された動物でなければ十分な効果は得られない。トコフェロールリン酸エステル又はその塩類のビタミンEへの変換活性の確認は通常動物の血液などの生体組織抽出液中にトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を添加しそのビタミンEへの変換を確認することにより容易に確認できる。ビタミンE（トコフェロール）の含有量の測定は、「ビタミン学実験法（1）」（日本ビタミン学会編、HPLCを用いる方法）により求めることができる。本発明者が現在までに確認したトコフェロールリン酸エステル



又はその塩類のビタミンEへの変換活性が認められた動物は数十種類に及ぶが、このうち特に有用と思われる動物は次のとおりである。即ち牛、豚、馬、羊等の家畜、犬、猫等のペット、ラット、マウス、モルモット、猿等の実験動物、肉鶏（ブロイラー）、採卵鶏、うずら、カモ、アヒル、キジ、七面鳥等の家禽、ハマチ、マダイ、イシガキダイ、テラピア、フグ、マグロ、ヒラメ、シマアジ、マアジ、サケ、コイ、ウナギ、ニジマス、アユ、エビ類（クルマエビ、ボタエビ、イセエビ、ロブスター、ザリガニ、ブラックタイガー）、カニ類（タラバガニ、ズワイガニ、ワタリガニ、ケガニ）、貝類（真珠貝、アワビ、ホタテ貝、アサリ、カキ）、及びスッポン、イカ、タコ、ウニ等の水産動物、及びカブトムシ、クワガタ、カイコが挙げられる。

#### 【0036】

【実施例】以下に本発明を実施例により具体的に説明するが本発明はそれに限定されない。

#### （1）トコフェロールリン酸エステル塩の合成

##### 試料I

d l- $\alpha$ -トコフェロール25.0g（0.058モル）をビリジン9.3gを含むメチルtert-ブチルエーテル75mlに溶解させておき、氷浴にて0℃まで冷却した。冷却後、オキシ三塩化リン9.8g（0.064モル）を攪拌下5分間で滴下した。滴下終了後、氷浴をはずし、なお3時間反応させその後、2N-水酸化ナトリウム水溶液を95ml加え10分間攪拌させ、さらに10%硫酸水溶液100mlを加えた後、分液漏斗にて有機層と水層とを分離した。有機層を1N-硫酸水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。その後、エバポレータにて濃縮乾固させ、そこへトルエン100mlと1N-硫酸水溶液100mlを加え、加熱還流下2時間反応させた。有機層を分離後、濃縮乾固させ1-プロパノール100mlを加えた。そこへ、水酸化ナトリウム2.4gを溶解させたメタノール25mlを滴下し、35℃～40℃に加熱した。1時間反応させた後に、生じた沈澱物を濾別し、1Lのメタノールに溶解後、150mlに濃縮した。その後、アセトン200mlに滴下し白色沈澱物を析出させ、アセトンで洗浄後減圧乾燥することにより白色粉末18.2gを得た。

【0037】この粉末の赤外吸収スペクトルと元素分析値は以下のとおり。

<sup>31</sup>P-NMR（CD<sub>3</sub>OD、 $\delta$ 値、ppm単位、85%リン酸基準）

2.9

赤外線吸収スペクトル（FT-IR；KBr，cm<sup>-1</sup>）

1030

1111

1169

1250

2500～3200

#### 元素分析

	計算値（%、注1）	分析値（%）
C；	65.39	65.80
H；	9.46	9.13

注1）C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>PNaとしての計算値

【0038】次に上記粉末を液体クロマトグラムにより分析した。オクタデシル基結合ポリメタクリレート系ゲル充填カラム（Shodex RS pak D18-613 6φ×150mm）と紫外可視分光検出器とから構成された分析装置を用い、装置に上記試料を注入し、（±）-DL-トコフェロールフォスフェイト（シグマ社製）10mgを溶離液に溶解させ、20μlを注入し、分析を行ったところ大小2つのピークを示すクロマトグラムが得られた。大きなピークはトコフェロールリン酸エステル、また、小さなピークはP、P'-ビストコフェロールジリン酸エステルであることが<sup>31</sup>P-NMRより明らかとなった。

溶離液；MeOH/H<sub>2</sub>O=100/1（1L中 0.05mol CH<sub>3</sub>COONaを含む）

溶離速度；0.5ml/min

紫外可視分光器；日本分光社製 875-UV

検出波長；287nm

カラム温度；40℃

#### 【0039】試料II

試料Iの合成法における水酸化ナトリウムの代わりに水酸化カリウムを用い、他は同様にしてd l- $\alpha$ -トコフェロールリン酸エステルのカリウム塩を得た。その純度は試料Iと殆ど同じであった。

#### 【0040】試料III，試料IV

試料Iの合成法における水酸化ナトリウムの代わりに水酸化カルシウム及び水酸化マグネシウムを用い、他は同様にしてd l- $\alpha$ -トコフェロールリン酸エステルのカルシウム塩（試料III）及びマグネシウム塩を得た（試料IV）。

#### 【0041】（2）ペレットの製造

「ルカロチン10wt%」（BASF社製； $\beta$ -カロチン含有量10wt%）60g、上記試料I（d l- $\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウム）120g及び小麦粉を混ぜて合計1kgからなる混合物と共に水0.1Lをエクストルーダーに供給し、これを混練して棒状に押出後、切断、乾燥して、直径3.2mm、長さ5mmの家畜、家禽、水産動物用ビタミンE強化用ペレット（水分含量9.5%）を製造した。

#### 【0042】（3）雌牛へのペレット給与と試験

乳中の体細胞数が4×10<sup>5</sup>個/ml以上である潜在性乳房炎と考えられる乳牛（ホルスタイン種）16頭（平均体重655kg/頭）を準備し、これらを4頭ずつ4群に分けた。第1群の乳牛に対しては、d l- $\alpha$ -トコフェロールリン酸塩の中のd l- $\alpha$ -トコフェロールの給与量が1g/日・頭になるように、試料Iを含む上記

ペレットを1日おきに飼料に添加して給与し、それを1カ月継続した。第2群の乳牛に対しては、上記ペレットからルカロチン10%のみを取り除きその他は同様の組成、製造方法でペレットを作成し、d1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸塩の中のd1- $\alpha$ -トコフェロールの給与量が1g/日・頭になるように、ペレットを1日おきに飼料に添加して給与し、それを1カ月継続した。

【0043】第3群の乳牛に対しては、d1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸塩の代わりにd1- $\alpha$ -トコフェロール酢酸を混合しその他は同様の組成、製造方法でペレットを作成し、d1- $\alpha$ -トコフェロールに換算したビタミンEの給与量が1g/日・頭になるように、ペレットを1日おきに飼料に添加して給与し、それを1カ月継続した。第4群の乳牛に対しては、d1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸塩の代わりに無機リン酸ナトリウムを混合しその他は同様の組成、製造方法でペレットを作成し、d1- $\alpha$ -トコフェロールに換算したビタミンEの給与量が1g/日・頭になるように、実施例1のペレットを1日おきに飼料に添加して給与し、それを1カ月継続した。

【0044】1カ月後に搾乳した乳中の体細胞数を測定したところ、第1群の乳牛では、乳中の体細胞数が、給与1カ月後に当初の9%にまで減少し、乳房炎の治療に極めて効果があったことがわかる。これに対し第2群の乳牛では、乳中の体細胞数が、給与1カ月後に当初のほ\*

\*は33%にまで減少し、かなりの効果があるが第1群の方が効果は大きかった。第3群の乳牛では、乳中の体細胞数が、給与1カ月後に当初のほぼ71%にまで減少したが本発明の第1群及び2群ほどの効果には及ばなかった。第4群の乳牛では、乳中の体細胞数の有意な変化は認められなかった。

#### 【0045】(4) ニジマスの発育試験

ニジマスの育成用飼料としてトコフェロール類が添加されていない市販の飼料を用い、これに試料IIIのd1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸カルシウム及び試料IVの同マグネシウム塩を添加し、発育促進効果をみるために以下の実験を行った。

#### 実験方法

供試品：第1区としてd1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸カルシウムを300ppm、L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム200ppm添加した飼料を作成した。第2区としてd1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸カルシウムを300ppm添加した飼料を作成した。第3区としてd1- $\alpha$ -トコフェロール酢酸を300ppm添加した飼料を作成した。

実験手順：一匹当たり平均体重20gのニジマスを1区525匹当て40日間飼育した。試験結果を表1に示す。

#### 【0046】

#### 【表1】

#### ニジマスの発育試験

	日間増重量 (g/尾/日)	飼料効率
第1区	0.24	0.75
第2区	0.22	0.72
第3区	0.20	0.68

表1に示すように、d1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸のカルシウム塩及びマグネシウム塩はニジマスに対する発育促進効果があることがわかった。上記で飼料効率とは試料添加量に対する体重増加率である。

#### 【0047】(5) マウスの発育試験

マウスの飼料に試料I d1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウムを添加し、発育促進効果をみるために以下の実験を行った。

供試品：d1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウム1

0ppm(第1区)、100ppm(第2区)添加した飼料を作成した。対照区としてd1- $\alpha$ -トコフェロール酢酸10ppm添加した飼料を作成した。

実験手順：一匹当たり平均体重24.5gのSPFマウスを1区10匹当て29日間飼育した。試験結果を表2に示す。

#### 【0048】

#### 【表2】

## マウスの発育試験

	平均増体重量
対照区	2.95 g
第1区	3.80 g
第2区	4.50 g

表2に示すように、 $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウムはマウスに対する発育促進効果があることがわかった。

## 【0049】(6)ブロイラーの発育試験

ブロイラーの前記肥育用飼料に試料IIの $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸カリウムを添加し、発育促進効果をみるために以下の実験を行った。

## 実験方法

\*供試品： $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸カリウム30 ppm添加(試験区)した飼料を作製した。無添加飼料を対照区とした。

実験手順：平均体重40gの鶏を1区20羽当て30日間飼育した。試験結果を表3に示す。

【0050】

【表3】

\*  
ブロイラーの発育試験

	試験区	対照区
平均増体重	885 g	835 g
飼料要求率	1.50	1.59

表3に示すように、 $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸は鶏に対する発育促進効果があることがわかった。上記で試料要求率とは、単位体重当たり要求される試料量の比率である。

## 【0051】(7)鶏卵のビタミンE増加試験

204日齢の産卵鶏300羽を100羽ずつ3つの区分に分け、第一区には試料Iの $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウム30 ppmを添加した飼料を、第二区には $\alpha$ -トコフェロール酢酸30 ppm添加した飼料を、そして第三の区分には対照区として $\alpha$ -トコフェロール類を添加しない産卵鶏用飼料を、途切れる事なく給与し、給与後1カ月目に産卵した卵について、ビタミンEを測定した。その結果を対照区のビタミンE濃度を1とした場合の比率で下表に示した。飼料は以下の組成のものを用いた(数字は重量部)。トウモロコシ56.3部、マイロ9.0部、ふすま5.0部、脱脂米糠2.3部、大豆粕7.0部、魚粕7.0部、アルファルファミール2.0部、炭酸カルシウム7.1部、第3リン酸カルシウム1.2部、食塩0.2部、ビタミン・ミネラルミックス0.1部、タロー油脂1.0部、コーングルテンミール1.8

【0052】なお、卵黄のビタミンEの含有量の測定

は、「ビタミン学実験法(1)」(日本ビタミン学会編)のHPLCを用いた方法により求めた。値は20個の平均から算出した。

## 30 鶏卵中のビタミンE蓄積比率

第1区 7.3

第2区 2.5

対照区 1.0

## 【0053】(8)ビタミンE変換試験

試験方法：下表の動物より摘出した腸管又は内蔵2g、又は血液の血漿2cc又は個体ミンチ2gを試料Iの $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウムの0.01wt%水溶液5ccとともに冷温下でホモジナイズ、混合した後この溶液中の $d1-\alpha$ -トコフェロール量をHPLC法で測定した。これを反応前のビタミンE量とした。次にこの液をpHを4.8にリン酸バッファーで調整し40℃で30分間腸管抽出溶液と反応させた後水酸化ナトリウムでpHを9に調整し更に40℃で30分間反応させビタミンEをHPLC法で測定した。これを反応後のビタミンE量とした。この結果から以下の計算式により $d1-\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウムのビタミンEへの変換率をそれぞれの動物において求めた。

## 反応後のビタミンE量-反応前のビタミンE量

$$\text{ビタミンE変換率} = \frac{\text{反応後のビタミンE量} - \text{反応前のビタミンE量}}{\text{反応前のビタミンE量}} \times 100$$

## 反応後のビタミンE量

【0054】その結果を下記示す。この結果から実験した全ての動物においてd1- $\alpha$ -トコフェロールリン酸ナトリウムをビタミンEへ変換する作用が確認された。牛腸管(75)、豚腸管(90)、馬血漿(63)、羊腸管(81)、犬血漿(51)、猫血漿(46)、ラット血漿(53)、マウス血漿(34)、モルモット血漿(57)、猿血漿(41)、鶏腸管(84)、うずら腸管(75)、カモ腸管(86)、アヒル腸管(72)、キジ腸管(75)、七面鳥腸管(84)、ハマチ腸管(76)、マダイ腸管(68)、イシガキダイ腸管(88)、テラピア腸管(72)、フグ腸管(94)、マグロ腸管(84)、ヒラメ腸管(64)、シマアジ腸管(77)、マアジ腸管(86)、サケ腸管(79)、コイ腸管(72)、ウナギ腸管(82)、ニジマス腸管(73)、アユ腸管(91)、クルマエビ中腸腺(88)、ボタンエビ中腸腺(79)、イセエビ中腸腺(85)、ロブスター中腸腺(71)、ザリガニ中腸腺(90)、ブラックタイガー中腸腺(74)、トラバガニ中腸腺(86)、ズワイガニ中腸腺(74)、ワタリガニ

中腸腺(84)、ケガニ中腸腺(84)、真珠貝個体ミンチ(77)、アワビ個体ミンチ(55)、ホタテ貝個体ミンチ(80)、アサリ個体ミンチ(68)、カキ個体ミンチ(57)、及びスッポン血漿(69)、イカ内蔵(75)、タコ内蔵(81)、ウニ内蔵(70)、カブトムシ個体ミンチ(79)、クワガタ個体ミンチ(72)、カイコ個体ミンチ(66)

( )内は上記計算式で求めた数値

## 【0055】

【発明の効果】本発明のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類は、動物に投与すると容易にトコフェロール(ビタミンE)に変換され、高いビタミンE活性を示し、吸収効果が大きい。その結果家畜、家禽、水産動物に対し発育効果が大きく、また乳牛の乳房炎の治療に大きな効果がある。また熱に対して安定であり、組成物等を加熱下で製造することもできる。更に高純度のトコフェロールリン酸エステル又はその塩は水に溶解するので取扱いも容易である。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成16年11月11日(2004.11.11)

【公開番号】特開平10-155429

【公開日】平成10年6月16日(1998.6.16)

【出願番号】特願平8-332931

【国際特許分類第7版】

A 2 3 K 1/16

A 2 3 K 1/18

A 6 1 K 31/355

// C 0 7 D 311/72

【F I】

A 2 3 K 1/16 3 0 2 B

A 2 3 K 1/18 D

A 6 1 K 31/355 A F C

C 0 7 D 311/72 1 0 2

【手続補正書】

【提出日】平成15年11月17日(2003.11.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項7】

トコフェロールリン酸エステル又はその塩類が、高速液体クロマトグラム法で測定するときトコフェロールリン酸エステル又はその塩類が95%以上であり、不純物として含まれるP、P'-ビストコフェロールジリン酸エステル又はその塩類が5%以下である高純度のトコフェロールリン酸エステル又はその塩類を含有する請求項1、4又は5記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

牛、豚、馬等の家畜動物、犬、猫等のペット、ラット、マウス、モルモットなどの実験用動物を含む有用哺乳動物の飼育においては、人類にとって有用なため効率的な生産が行われておりそれ故飼育密度の増加にともなう老化の促進、抗病性の低下、ストレスの発生、肉質の酸化の促進、肉色の黒化等の肉質の悪化、繁殖障害などが増加の傾向にある。また、繁殖障害などは、早期流産、受胎率の低下、排卵遅延、胚の死亡、発情徴候の微弱化、黄体ホルモンの産生低下などによってもたらされ、また乳房炎が発生すると、乳中の体細胞数が増加して、乳の商品価値が著しく低下するが、そのような繁殖障害や乳房炎などの治療や予防のために従来からビタミンE及びその誘導体を含む各種のビタミンやミネラル又はそれらを組み合わせたもの等が飲料水や飼料中に添加され有用哺乳動物に給与されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

(3) 雌牛へのペレット給与試験

乳中の体細胞数が  $4 \times 10^5$  個/ml 以上である潜在性乳房炎と考えられる乳牛（ホルスタイン種）16頭（平均体重 655 kg/頭）を準備し、これらを4頭ずつ4群に分けた。

第1群の乳牛に対しては、d l -  $\alpha$  - トコフェロールリン酸塩の中の d l -  $\alpha$  - トコフェロールの給与量が 1 g/日・頭になるように、試料 I を含む上記ペレットを1日おきに飼料に添加して給与し、それを1カ月継続した。

第2群の乳牛に対しては、上記ペレットからルカロチン 10% のみを取り除きその他は同様の組成、製造方法でペレットを作成し、d l -  $\alpha$  - トコフェロールリン酸塩の中の d l -  $\alpha$  - トコフェロールの給与量が 1 g/日・頭になるように、ペレットを1日おきに飼料に添加して給与し、それを1カ月継続した。